

Ⅱ SPP 教員研修ーバイオテクノロジーの基礎技術

小林英三郎*, 北川 浩子*

KOBAYASHI,Hidesaburo ; KITAGAWA,Hiroko

生命物質の構造と機能の研究は、20世紀前半に広く展開され生命現象の基礎を確立した。20世紀後半は生命科学の時代ともいわれ、生命現象の解析はコンピュータ技術と共に大きな発展がなされた。さらに、世紀の変わり目にはヒトゲノム計画に代表されるように、大腸菌、酵母、線虫、シロイヌナズナなどの各ゲノム (genome) 解析が完了し、生命の設計図を手にすることができた。

DNA に書かれたこれらの設計図から明確な構造を持つゲノムが解析され、ヒトでは約 32,000 (解析された 31,778 と推定ゲノムの合計)、酵母、線虫、シロイヌナズナではそれぞれ、6,144, 18,266, 25,706 の遺伝子を含んでおり、これらのほとんどがタンパク質の構造をきめる情報になっていると考えられている。しかしながら、簡単な体制をもつ単細胞生物の大腸菌でさえ約 4,000 種類のタンパク質の設計図があり、さらにこれらのタンパク質の多くは翻訳後修飾 (posttranslational modification) というリン酸化や糖の結合などの反応を受けるので、細胞一つを取り上げてもタンパク質の種類は膨大なものになる。このようなタンパク質の総体をプロテオーム (proteome) といい、ゲノムとタンパク質の統合的解析を目的としている。

一方、生命現象を情報の流れとして捉え、情報解析の手法を用いることによって生命現象を解析すること、すなわちバイオインフォマティクス (bioinformatics) という従来の境界領域を超える分野が展開されている。先に述べたゲノム解析、プロテオーム解析で得られた情報はバイオインフォマティクスの基礎データとなり、また、これらの解析手法は近年急速に進歩を遂げ、その応用分野は医学、薬学、栄養学、農学などの広い範囲にわたってその成果が示されている。

我々は、「文部科学省サイエンスパートナーシップ・プログラム (SPP) 教員研修」の補助を受け、中学、高等学校で教鞭をとる教員を対象に、生命現象解析の基礎となる技術「バイオテクノロジーの基礎技術」を修得するプログラムを実施した。このプログラムでは2つの基礎技術、「PCR法を用いたDNAの検索」および「タンパクの質量測定」を取り上げ、操作および解析方法についての研修を目的とした。

* 城西大学理学部化学科

I. 「PCR法を用いたDNAの検索」における情報機器の活用について

北川 浩子

はじめに

核酸など、生体物質を取り扱う技術（バイオテクノロジー）は進歩が早く、その原理はとてもユニークなものが多い。中でも「塩基配列決定法」や「遺伝子増幅法」は1980年代から実用化された技術で、ともにノーベル賞を受賞しており、バイオテクノロジーの関連分野を大きく進展させている。最近では医療方面にも大きく貢献をしているばかりでなく、薬学、栄養学、農学はもとより、法医学、考古学の分野でも多用されている。これらのバイオテクノロジー技術を中学、高校の先生方が理解し、理科教育に役立ててもらいたく思い、SPP教員研修に参加した。本報告では、「塩基配列決定法」および「遺伝子増幅法」の原理から実験手法までを、2日間という短時間内で効率よく理解してもらうために、どのようにマルチメディアを使って「PCR法を用いたDNAの検索」を説明し、実習実験予備知識としたかを紹介する。

1. 遺伝子増幅法（PCR法）について

物質の反応はアニメーションを使いわかりやすく説明した。図I-1「DNAを増やしてみよう」では、まずDNAの構造、即ちDNAがヌクレオチドから構成されており、2重らせん状態であることを示し、PCR法によってDNAそのものが増えることを表した。

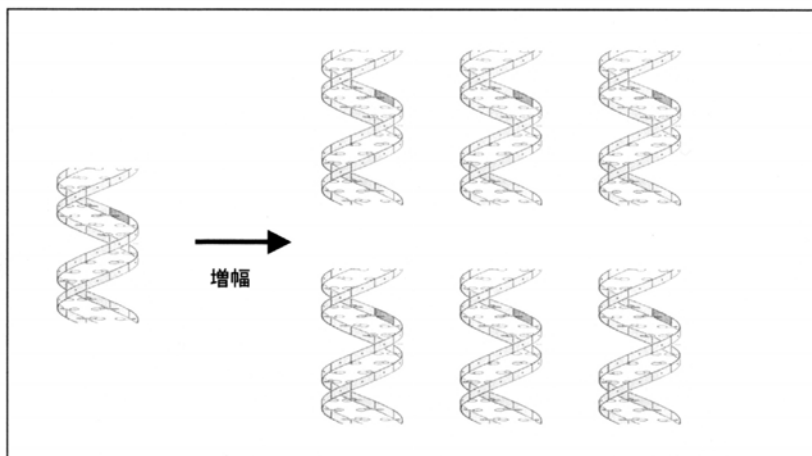


図 I - 1 DNAを増やしてみよう

2. PCR法実験原理

実際の原理については図 I-2 に示した。PCR法は鋳型DNAの変性→プライマーのアニール→相補鎖の伸長という反応を繰り返すことにより、DNAが増えていく反応であるが、ここで問題となるのが言葉の壁である。「鋳型DNA」、「変性」、「プライマー」、「アニール」、「相補鎖」、「伸長」という言葉は何を表しているのかということを理解してもらわなければならない。そこで、それぞれの反応がどんな反応なのか、それがどうつながっていくのかをアニメーションにより示した。図 I-3, 4, 5, 6 に反応の流れを示した。反応前に溶液中の物質（鋳型DNA、プライマー、ポリメラーゼ、dNTP）を示し、それぞれの物質の役割を説明した（図 I-3）。変性反応においておこる鋳型DNA鎖の分離の様子を図 I-4 に、分離したそれぞれの鎖に対してプライマーが結合する様子を図 I-5 に示した。次に結合したプライマーから鋳型DNAに対して相補的なdNTPがDNAポリメラーゼによって結合していく様子を図 I-6-1 ～2 で表した。

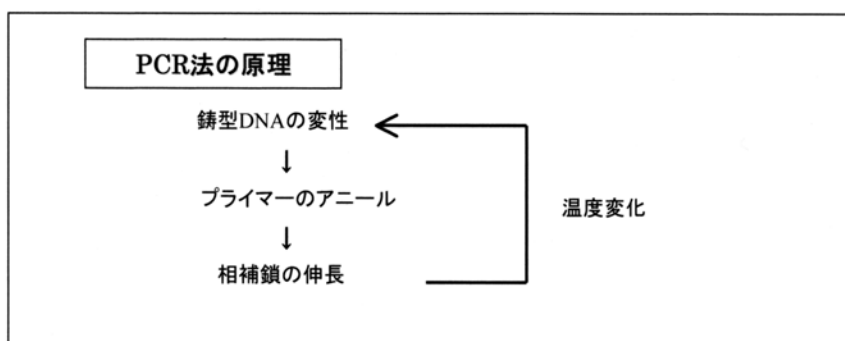


図 I-2 PCR法について

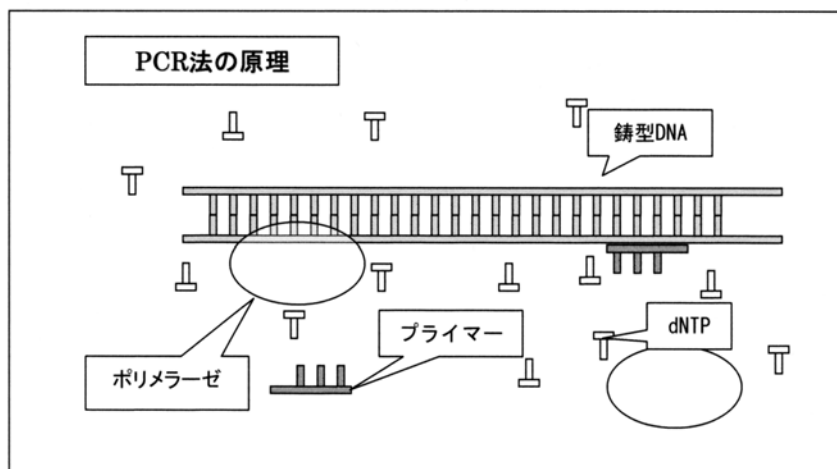


図 I-3 PCRに必要な試薬

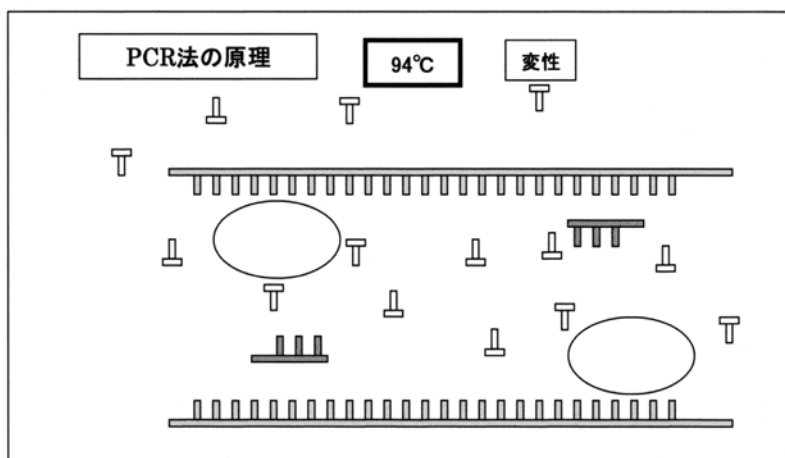


図 I - 4 変性の原理

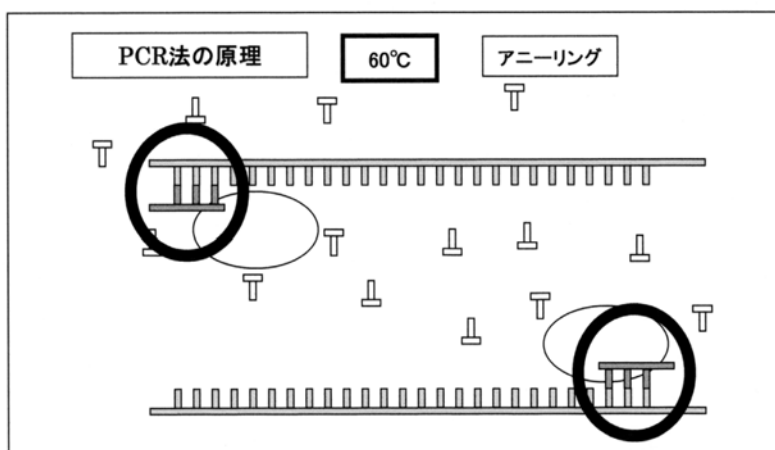


図 I - 5 アニーリングの原理

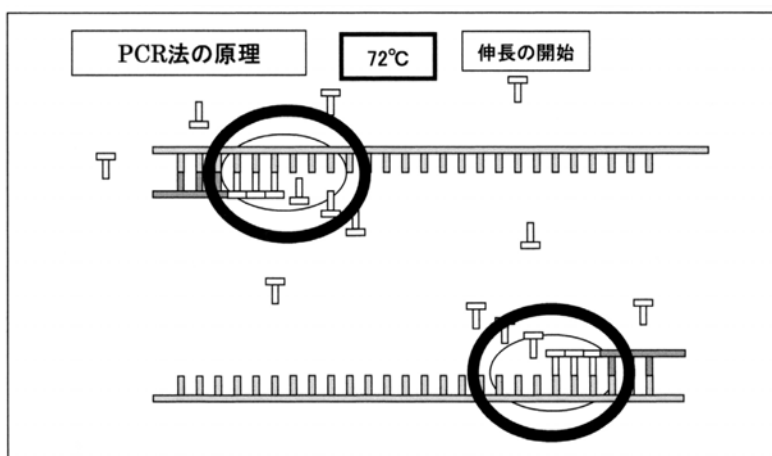


図 I - 6-1 相補鎖の伸長

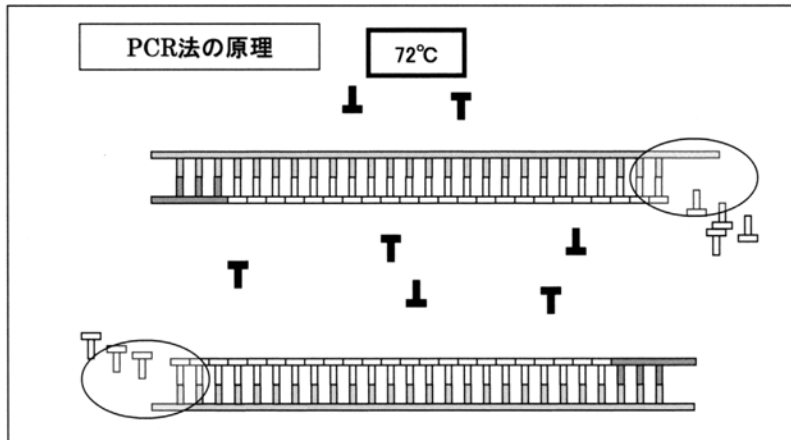


図 I-6-2 相補鎖の伸長

3. 塩基配列決定法とDNAシーケンサーの原理

同様に塩基配列決定法とDNAシーケンサーの原理と方法について説明し、約1時間ですべての説明を終了したが、少人数での座学であったので、質問にも十分答える時間を持てた。これらの解説に基づいて「PCR法によるDNAの増幅」および「増幅したDNAの塩基配列分析」の各実験を行った。

終わりに

5名の先生はとても熱心に実験に取り組んでいて、実験中も活発な質問がでていた。しかし実験ではいままで扱ったことのない器具（ピペッターなど）の取り扱いや、マイクロリットルという微量のハンドリングに戸惑っていた。今後は器具の使い方についての説明も、動画などの補助手段を取り入れて解説することを考えている。

Ⅱ. 「タンパクの質量測定」における情報機器の活用について

小林 英三郎

はじめに

タンパク質の総体をプロテオームというが、この解析の基本は質量数千から数万種類に及ぶ生体に存在するタンパク質を、迅速かつ高感度で可能な限り網羅的に同定することである。この手法は分離と検出の両方法の修得が必要とされるが、ここでは検出に必要な技術であるタンパク質の同定に必要なレーザーディソープション飛行時間型質量分析機 (MALDI-TOF/MS) による分子量測定実習を行った。MALDI-TOF/MS によるタンパク質の質量分析方法は、2003 年にノーベル賞を受賞した田中耕一らの考案によるマトリクスを用いてタンパク質をレーザービームによりイオン化する方法であるが、測定試料の調製および質量測定は比較的短時間の実習で修得できる。

ここでは、理学部 (1 号館) マルチメディア教室を使い、座学「タンパク質と質量分析の一般知識」で質疑応答を含めた実験目的の理解を深め、機器分析センターで MALDI-TOF/MS「タンパク質の質量測定」を実習した概要を報告する。

1. タンパク質と質量分析の一般知識

「タンパク質の構造および生合成」、「タンパク質のアミノ酸配列決定法」、「タンパク質の質量分析はなぜ必要か?」、「質量分析の歴史」、「MALDI-TOF/MS の原理」の座学を行い、タンパク質の構造特性、生化学的機能、分析原理について解説した。

この解説で使用したパワーポイントの資料の一部を示す。プロテオームとデータベースの関係について「生命情報の包括的解析とデータベース」(図Ⅱ-1)、「ゲノムとプロテオームの性質」(図Ⅱ-2)などを用い、インターネットを使うデータベースアクセスの実際を解説し、「TOF の原理」、「プロテオーム解析における質量分析」などで、飛行時間型質量分析の原理を解説した。

これらの解説は 90 分間で行ったが、パワーポイントを使用し随所にアニメーション効果を使用すること、およびその関連資料を配布することで、比較的よい理解が得られたと思われる。しかしながら、質量分析に使われる一部の専門用語についての解説はさらに追加する必要があった。

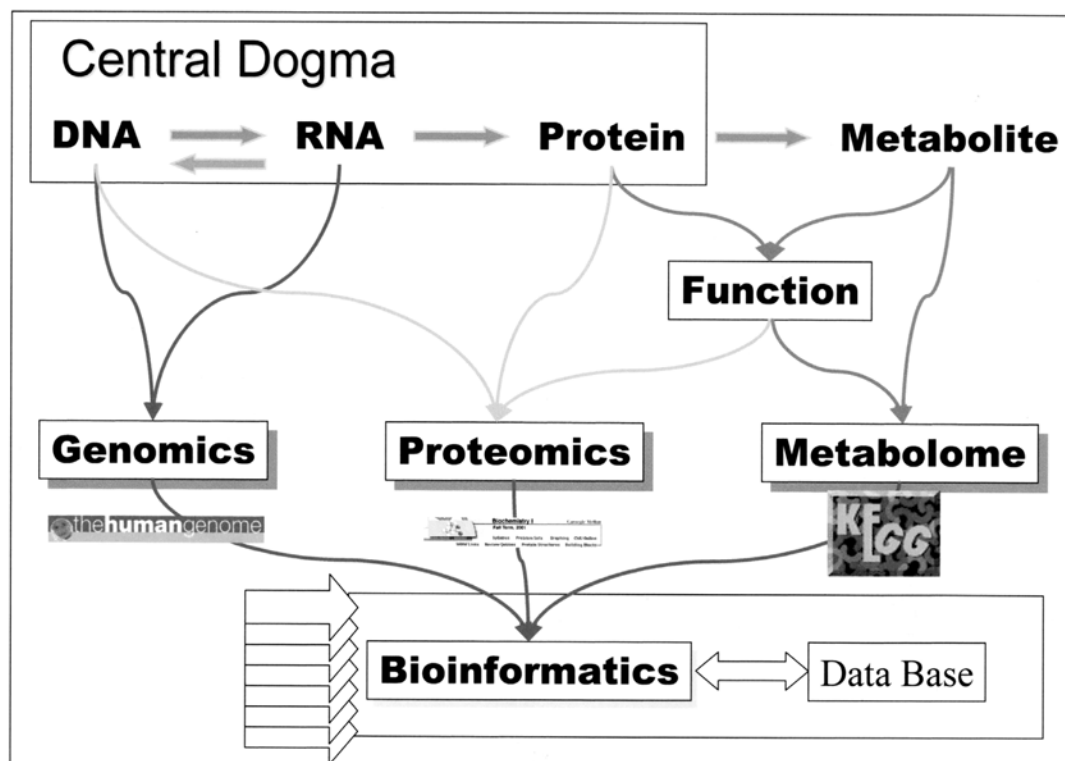
2. 実験の手順解説とタンパク質の質量測定

今回使用した質量分析装置 VISION 2000 (Finnigan MAT Laser Desorption Time Of Flight Mass

Spectrometer)の使用手順について説明を行った。実習実験では「サンプルターゲット」(図II-5)のアダプター小孔を通してターゲットプレート上に試料をマイクロピペットで1 μ L の少量をのせる技術が難航した。しかしながら、試料室の予備排気を操作する「コントロールパネルの操作手順」(図II-6)や「Data Acquisition の Control ウィンドウで測定条件の設定」(図II-7),「測定データ解析画面のプルダウンメニュー」(図II-8)および「測定データ画面」(図II-9)などのコンピュータから装置のコントロールなどは、パワーポイント資料により説明した効果があり、最小限の助言をするだけで測定操作を完結することが出来た。

おわりに

今回の受講者は5名であり、またタンパク質の質量分析目的を理解してくれたことと、やや複雑な実験操作手順を短時間で修得してくれたことで、ほぼ計画した時間内での実施が可能であった。今後、参加者の日程が調整できれば、実験時間を増やし実際のタンパク同定までの実習を行うことも有意義であると考えられる。



図II-1 生命情報の包括的解析とデータベース

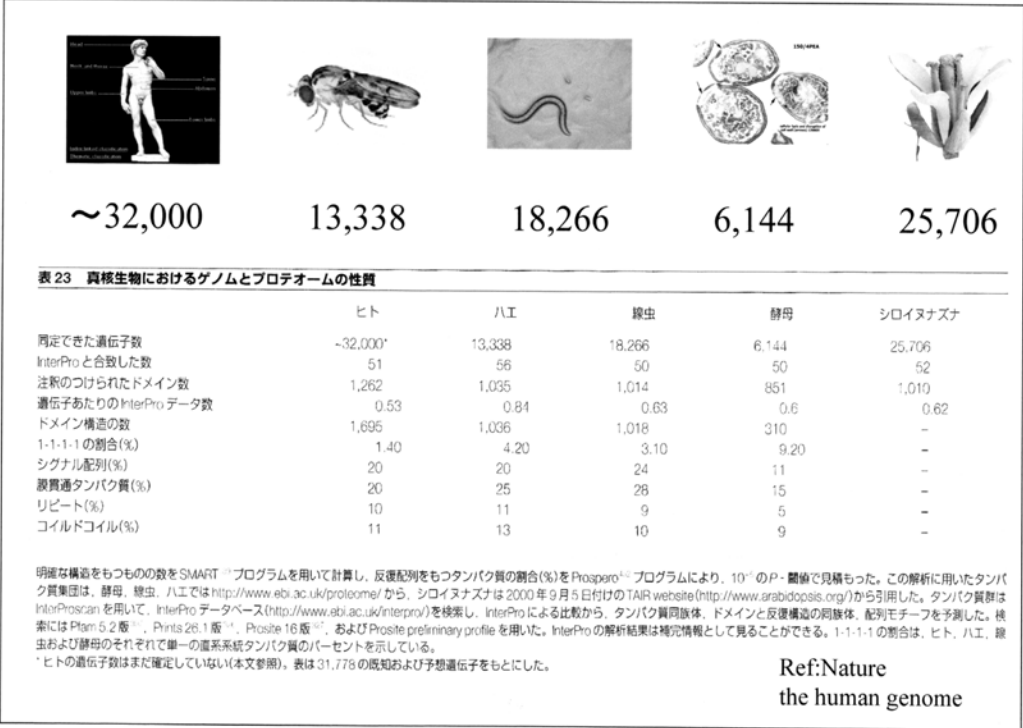


図 II-2 ゲノムとプロテオームの性質

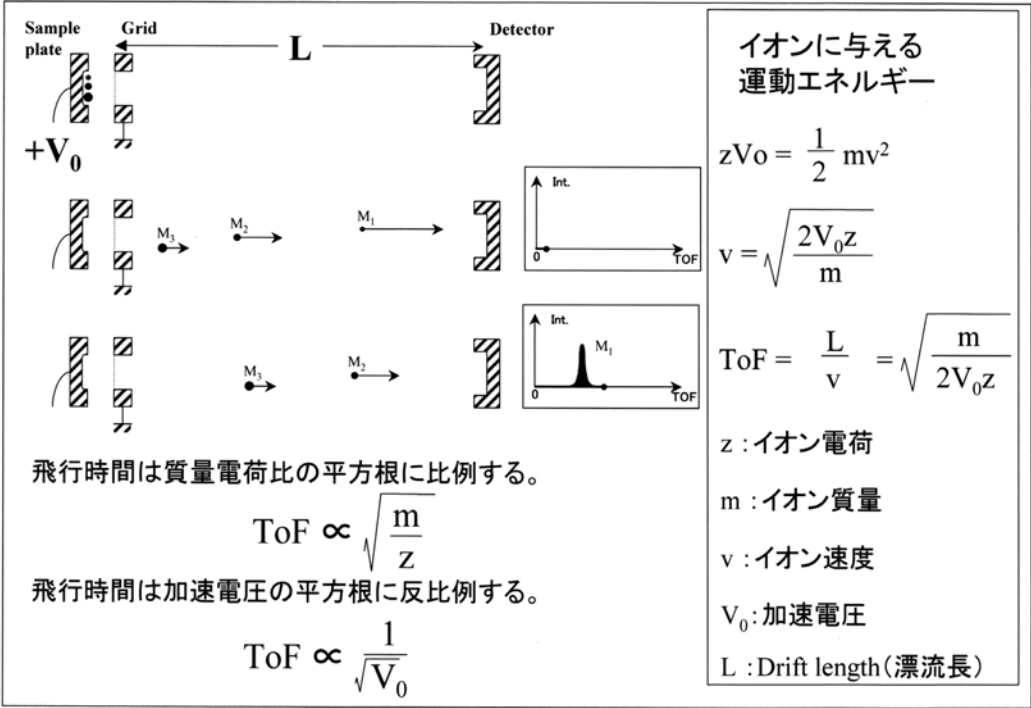


図 II-3 TOF の原理

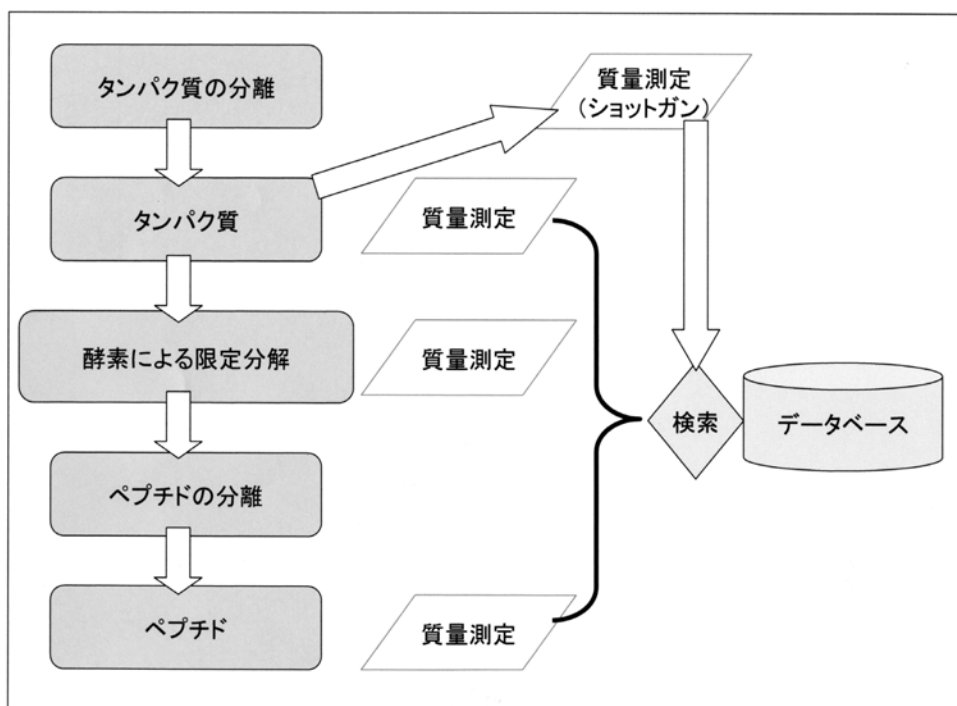


図 II-4 プロテオーム解析に於ける質量分析

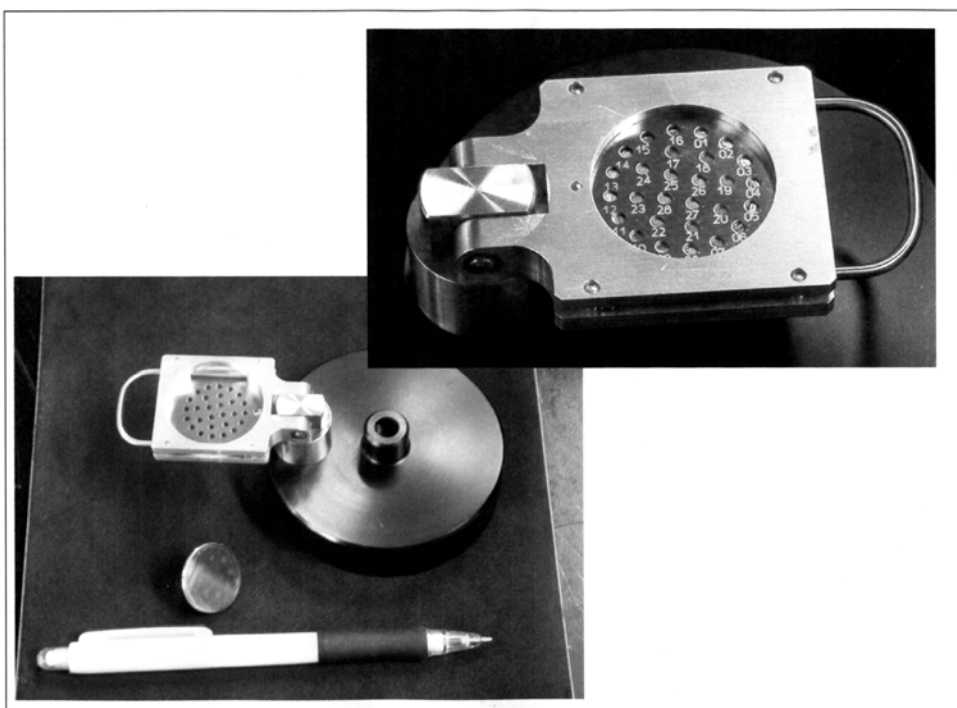


図 II-5 サンプルターゲット

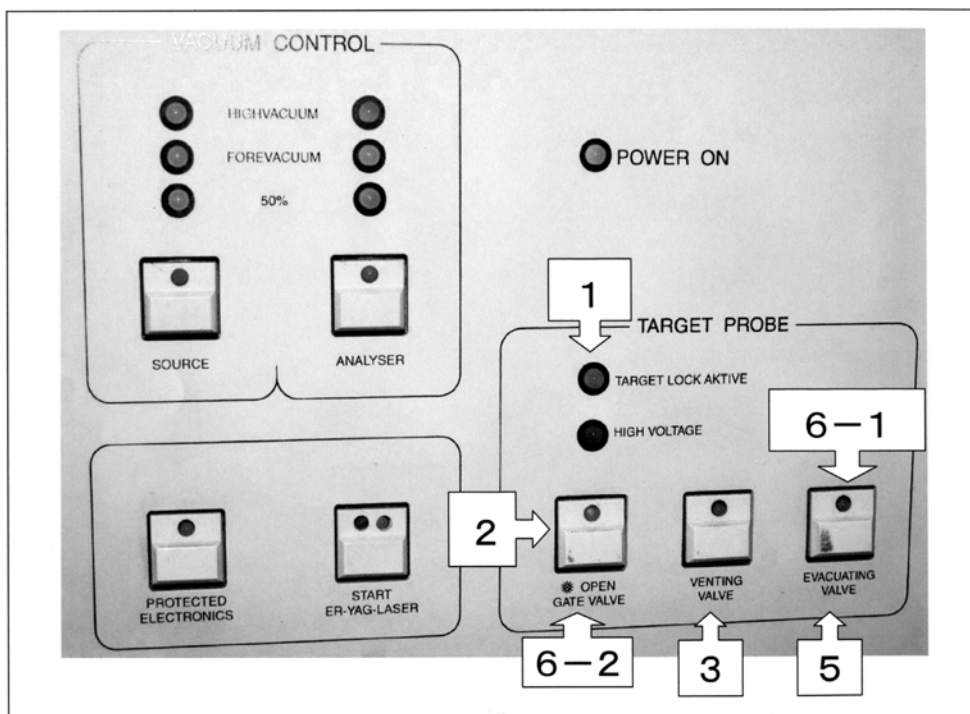


図 II-6 コントロールパネル

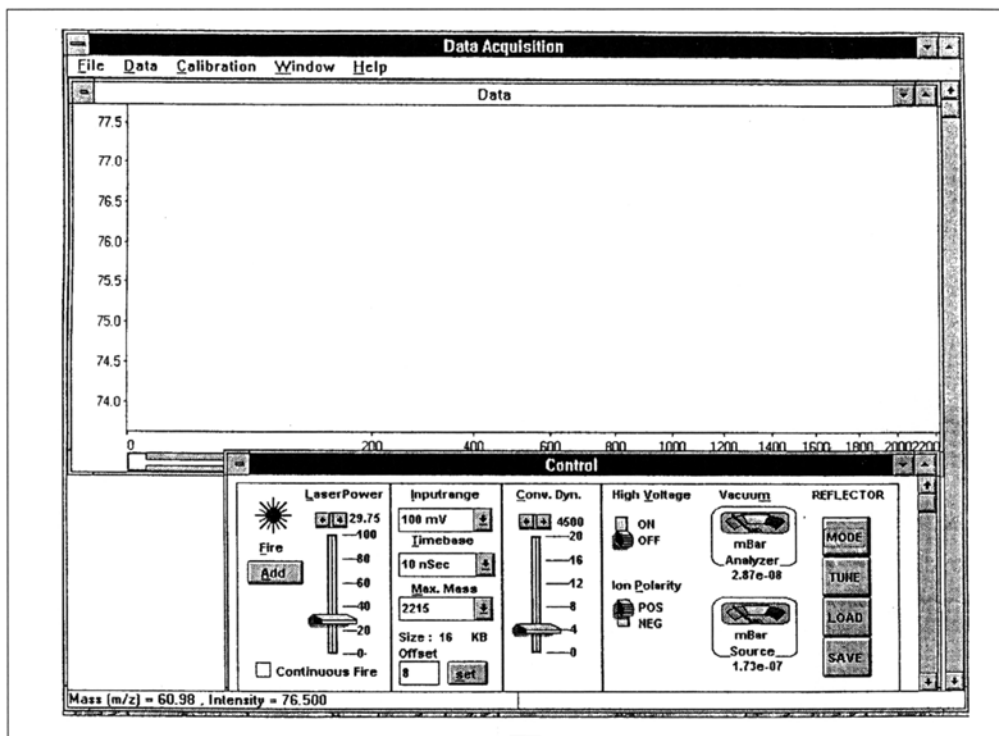


図 II-7 Data Acquisition の Control ウィンドウで測定条件の設定

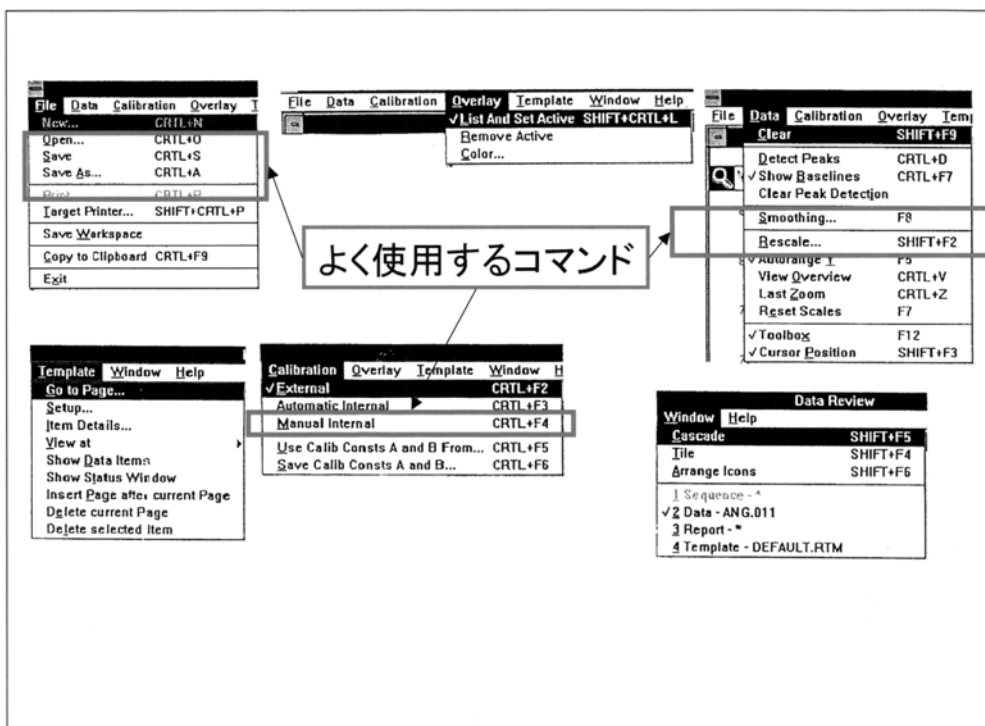


図 II-8 測定データ解析画面のプルダウンメニュー

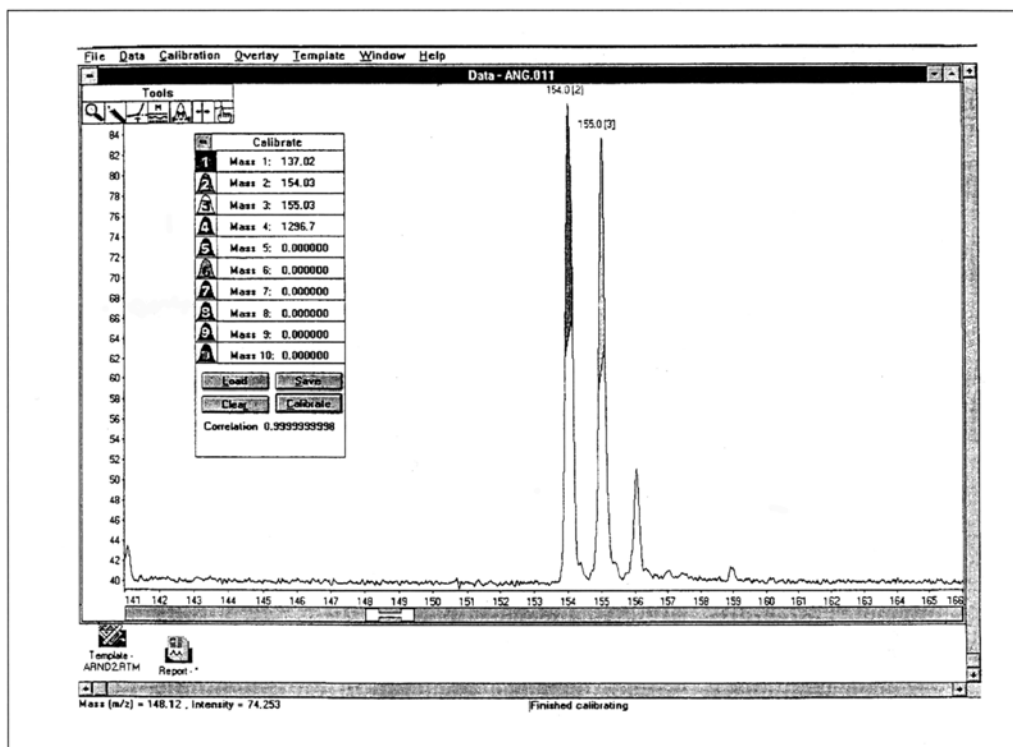


図 II-9 測定データ画面

「S P P教員研修－バイオテクノロジーの基礎技術」を実施して

今回実施した2つのテーマである「PCR法を用いたDNAの検索」および「タンパクの質量測定」では、装置のコントロールは全てコンピュータで行うシステムではあるが、これらの装置のパラメーター設定、データ解析、ファイル保存などのメニューは必ずしも解りやすいとはいえない。プルダウンメニューの項目が多く、初学者が短時間に理解するには若干改良が必要である。測定装置を作製するメーカーサイドで、「ユーザーフレンドリー」であるプログラム構造を構築する事も必要かと思われるが、エンドユーザーサイドで、より理解しやすく運用しやすいプログラムの開発も必要になる。

コンピュータの進歩と共に、科学計測のみならず、社会全般で情報のハンドリングが必須になってきているが、コンピュータリテラシーは初等教育で完成し、中等教育ではより高度な利用法を教育していく必要性が迫られている。これらの教育現場を預かる教育者にとって、先端技術に触れ“情報”の多様性を体験していただき次世代の情報教育の礎としていただければ幸いである。

S P P教員研修実施に際しては、申請書類および報告書などの窓口である三菱総研のS P P担当者にはさまざまな助言をいただき、また、本学学務課には県教育委員会との連絡を、情報センターには募集に関するI T関連の便宜を図っていただいたこと、理学事務、営繕課、機器センターの担当各位には夏休み中の実施にもかかわらず、適切な対応をしていただいたことに感謝したい。

(Received Mar. 31, 2005)